家蚕转基因载体 pBacA3EG 的构建及其表达

徐汉福，夏庆友*，刘 春，吴雪峰，杨远萍，赵 萍，向仲怀

（西南农业大学，农业部蚕桑学重点实验室，重庆 400716）

摘要：以家蚕 *Bombyx mori* 肌动蛋白 A3(actin 3)启动子、增强性绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein，EGFP)基因及 SV40 的多聚腺苷酸识别序列为元件，经多次克隆，将其插入到 piggyBac 转座载体中。经 PCR、酶切鉴定及测序表明各元件已按正确的方式插入到 piggyBac 载体中。将构建好的 piggyBac 表达载体显微注射到胚盘形成前期的蚕卵中，在胚胎早期发育的第 3 天，通过体视荧光显微镜检测到蚕卵内发出较强的绿色荧光。结果表明该载体构建正确且能在蚕卵中进行表达。家蚕转基因载体的体外瞬时表达不但是成功进行家蚕转基因所必需的第一步，而且其自身也可以应用于基因的功能研究，为家蚕后基因组研究奠定了基础。

关键词：家蚕；转基因；A3 启动子；piggyBac；绿色荧光蛋白

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2005)05-0799-05

Construction and expression of the transgenic vector pBacA3EG in the silkworm *Bombyx mori*

XU Han-Fu，XIA Qing-You*，LIU Chun，WU Xue-Feng，YANG Yuan-Ping，ZHAO Ping，XIANG Zhong-Huai (The Key Sericultural Laboratory of Agricultural Ministry，Southwest Agricultural University，Chongqing 400716，China)

Abstract: Using three basic elements，*i.e.*，actin 3 promoter of *Bombyx mori*，enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene and the identified sequence of polyadenylation acid in SV40，the piggyBac transposon vector pBacA3EG was constructed. This vector was further confirmed by PCR，enzyme digestion and sequencing analysis，and the results showed that all elements had been inserted into the piggyBac vector correctly. Stronger green fluorescent was observed under the stereoscopic fluorescence microscope three days after the reconstructed vector was injected into the preblastodermic eggs. The results showed that the vector was constructed correctly and expressed in silkworm eggs. The transient expression of silkworm transgenic vector is not only the first step necessary for silkworm transgene，but also can be applied in gene function analysis，which establishes the foundation for functional studies of silkworm genome.

Key words: Silkworm；transgenesis；actin 3 promoter；piggyBac；green fluorescent protein

家蚕 *Bombyx mori* 作为蚕丝业的生物基础，为人类做出了巨大的贡献。最近完成的家蚕全基因组测序工作(Xia *et al*.，2004)，将促进家蚕的基础研究，并使家蚕作为模式昆虫对昆虫学科的发展起到积极的推动作用。在家蚕的全基因组框架图完成之后，目前的主要工作是对家蚕基因组计划所获得的大量基因进行研究，以探索其具体的生物学功能。由于转基因技术可以实现家蚕功能基因的过量表达或者基因功能的缺失，因此将成为研究家蚕基因功能的重要方法之一。同时，转基因技术也是利用功能基因开发新的蚕品种的关键，甚至还是实现利用家蚕合成有用蛋白质、开发家蚕生物反应器的技术关键。

尽管转基因技术在果蝇、蚊子等昆虫中已获得成功(Handler and Harrell，1999；Grossman *et al*.，2000，2001)，但在家蚕方面，由于蚕卵在构造上的特殊性，其比较成熟的转基因技术的建立也是近几年的事情(Tomita *et al*.，2003；Wu and Cao，2004)。Tamura 等(2000)首次报道通过显微注射的方式将携带增强性绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein，EGFP)基因的 piggyBac 载体注入胚盘形成前期的蚕卵，获得了发绿色荧光的转基因家蚕个体。目前，国内也有人通过同源重组和电击的方式进行

基金项目：国家自然科学基金项目(30270691，30330460)；科技部“863”计划(2004AA2Z1020)

作者简介：徐汉福，男，1978 年 12 月生，博士，研究方向为生物化学与分子生物学，E-mail：swau_xuhf@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：xiaqy@swau.cq.cn

收稿日期 Received：2004-11-03；接受日期 Accepted：2005-03-08

家蚕转基因研究,并检测到了阳性个体(郭秀洋等,2001;Guo *et al*., 2004),但总体来看目前转基因家蚕研究还处于一个起步阶段,技术的完善和实际应用将是今后的主要研究方向。

早期的转基因家蚕阳性个体的筛选主要是通过绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)标记进行,而且通常在转基因第 2 代(G1)才能对其表达进行检测,因此在比较低的转基因概率下(0.7% ~ 3.9%)(Chalfie *et al*., 1994),G1 和 G2 个体的饲养量大,获得转基因个体的周期也比较长。EGFP 由于荧光信号强而便于检测,且具有稳定性和无毒性等优点,成为新一代转基因标记,被广泛地用作转基因阳性个体的报告基因(Tamura *et al*., 2000; Horn *et al*., 2002)。因此,我们在 piggyBac 转座子载体体系上,利用 EGFP 作为报告基因,以家蚕肌动蛋白 A3 (actin 3)基因为启动子建立了一套快速检测 EGFP 表达和转基因家蚕阳性个体的筛选体系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 家蚕品种:家蚕品种 05-036(W3 的突变系)、夏芳(实用种)和大造 P50(纯种)由本校家蚕种质资源库提供。其中,05-036 系家蚕第三白卵(W3)突变系,为多化性不滞育种。幼虫在实验室按常规桑叶育法饲养。5 龄第 3 天提取 P50 蚕的后部丝腺用于提取基因组 DNA 扩增 A3 启动子;待蛹化蛾后,收集蚕蛾产卵后 5 h 的蚕卵用于显微注射。

1.1.2 菌株和质粒:宿主菌 *E. coli* Jm109 菌株和 pSLEGFP 由本实验室保存。pBSITR 和 pUASG 载体由 Andrea Brand 博士惠赠。

1.1.3 主要试剂:限制性内切酶 *Eco*RⅠ、*Spe*Ⅰ、*Sac*Ⅰ、*Xho*Ⅰ、*Bam*HⅠ及 T4 DNA 连接酶、DL2000 Marker 为 TaKaRa 公司产品。小量柱式胶回收试剂盒为上海华舜生物试剂公司产品。

1.2 方法

1.2.1 DNA 片段的回收和质粒 DNA 的制备:质粒 DNA 的制备采用 SDS 碱裂解法进行。DNA 分子片段的胶回收按小量柱式胶回收试剂盒操作说明进行。

1.2.2 重组表达载体的构建:家蚕后部丝腺基因组的提取按 Thomas 等(2002)方法进行。根据已报道的家蚕肌动蛋白 A3 基因的启动子区域设计引物进行 PCR 反应,引物序列为:

F: GACTCGAGAGAGGTTACAAGCGA;

R: GTGAGCTCTTCGTCGCACATCTT。

反应条件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,60℃复性 30 s,72℃延伸 1 min,共 30 个循环,72℃延伸 7 min,4℃保存。对 PCR 产物进行电泳检测,胶回收,*Sac*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ双酶切纯化,与经 *Sac*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ酶切的 pSL1180 连接转化筛选阳性克隆。同样,将 pUASG 经 *Bam*HⅠ酶切胶回收 EGFP 和 SV40 片段与克隆好经 *Bam*HⅠ酶切的 pSLA3 连接转化,筛选正向插入的阳性克隆得 pSLA3GSV40。用 *Eco*RⅠ和 *Spe*Ⅰ双酶切 pSLA3GSV40 胶回收 A3GSV40 片段,与经同样酶切的 pBSITR 连接转化筛选阳性克隆得 pBacA3EG。

1.2.3 蚕卵的准备、显微注射及荧光检测:将产卵后 5 h 的蚕卵用'502 胶'固定于载玻片上,卵孔朝上,用 37% 的甲醛蒸气消毒 2 ~ 3 min。然后用微量注射仪(NARISHIGE)进行注射。质粒终浓度为 1 μg/μL,注射量为 15 nL。蚕卵注射后立即用石蜡封口,甲醛蒸气消毒。将注射蚕卵置于 25℃条件下催青,使其正常发育,待其发育到第 3 天时在体视荧光显微镜下观察并照相。

2 结果

2.1 家蚕 pBacA3EG 转基因载体的构建

载体的构建过程如图 1 所示,根据已报道的家蚕肌动蛋白 A3 基因的启动子序列设计了引物,在引物的两端分别加上 *Sac*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ的酶切位点,以 P50 蚕的基因组 DNA 为模板进行 PCR 反应,得到大小为 762 bp 的产物(图 2: 2),再用 *Sac*Ⅰ和 *Xho*Ⅰ双酶切 pSL1180,将经过酶切的 A3 启动子与酶切回收的 pSL1180 连接转化,得到阳性克隆 pSLA3G。经酶切鉴定(图 2: 3)和测序结果(未列出)表明 A3 启动子序列已克隆到 pSL1180。将 pUASG 经 *Bam*HⅠ酶切胶回收 EGFP 和 SV40 片段,与经 *Bam*HⅠ酶切的 pSLA3 连接转化筛选阳性克隆得 pSLA3G。用 *Eco*RⅠ、*Spe*Ⅰ双酶切 pSLA3GSV40 胶回收 A3GSV40 片段,与经同样酶切的 pBSITR 连接转化,经酶切筛选得阳性克隆质粒 pBacA3EG。

2.2 注射家蚕品种的选择

由于部分家蚕品种的蚕卵自身会发出一定强度的荧光,对 EGFP 的检测造成干扰,因此,我们对几个品种的蚕卵自身荧光的发光情况进行了检测。结果发现不同家蚕品种蚕卵的发光情况有很大的差

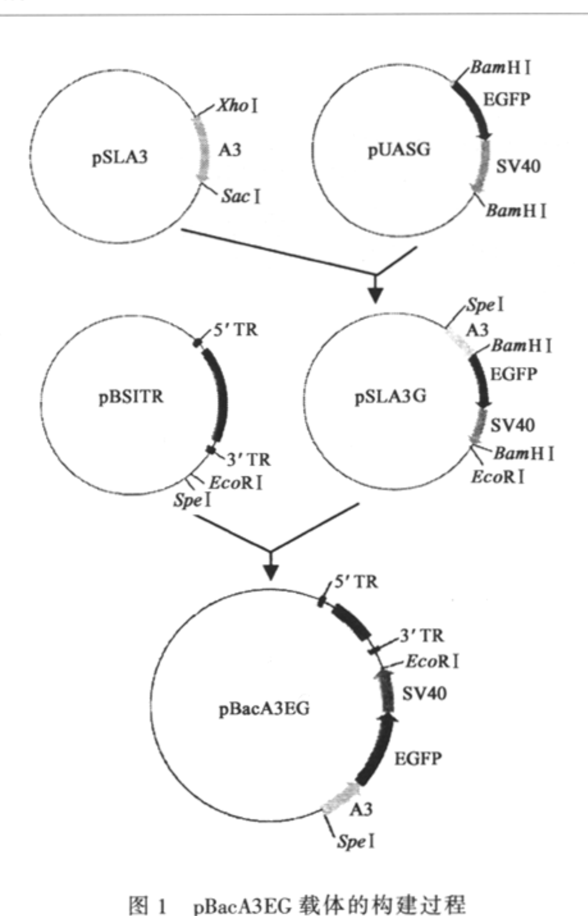


图 1　pBacA3EG 载体的构建过程

Fig. 1　Construction of pBacA3EG vector

异，夏芳和大造品种的正常蚕卵在着色前发出很强的绿色荧光(图 3：B2，B3)。为了检测荧光到底是来自卵壳还是卵内容物，将卵内容物用毛细玻璃管吸出在荧光下观察，结果未检测到荧光(图 3：C1、C2 和 C3)，说明荧光不是来自卵内容物，而是来自蚕卵卵壳。而 W3 的突变系 05-036 的蚕卵在绿色荧光激发下基本观察不到荧光(图 3：B1)，适合用作 pBacA3EG 转基因载体的体外瞬时表达。

2.3　pBacA3EG 转基因载体的体外瞬时表达

将终浓度为 1.0 μg/μL 的 pBacA3EG 质粒溶液注射到产后 5 h 的 05-036 品种蚕卵中，每粒蚕卵注射 15 nL 左右，以注射 pUASG 和不注射的蚕卵作为对照。待其胚胎发育到第 3 天，在体视荧光显微镜下对蚕卵的发光情况进行观察。结果表明，只有在注射了 pBacA3EG 的蚕卵中检测到了强烈的绿色荧光，而在注射了 pUASG 和未注射的蚕卵中则几乎检测不到绿色荧光(图 4)。为了进一步确定是蚕卵内发出的绿色荧光，用毛细玻璃管吸出卵内容物，发现只有注射了 pBacA3EG 的卵内容物发出绿色荧光，注射 pUASG 和未注射的都检测不到。

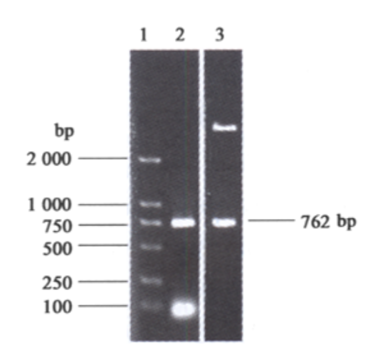


图 2　A3 启动子 PCR 产物及 pSLA3 质粒的酶切电泳图

Fig. 2　PCR product of A3 promoter and enzyme digestion of pSLA3 plasmid

1. 标准 DNA Marker DL2000；2. A3 启动子 PCR 产物 PCR product of A3 promoter；3. pSLA3 质粒的酶切 pSLA3 plasmid after *Xho* Ⅰ and *Sac* Ⅰ digestion.

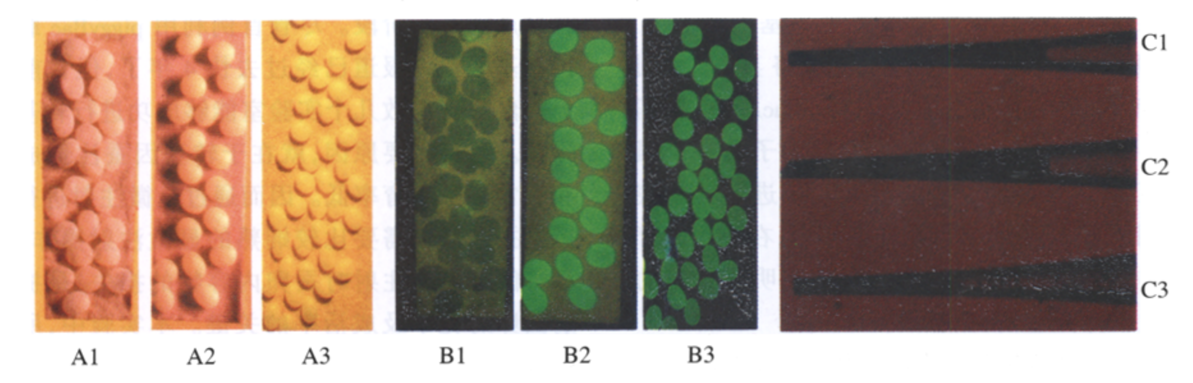


图 3　不同家蚕品种蚕卵在正常光下和绿色荧光激发下的发光情况

Fig. 3　Varying silkworm eggs under normal light and stereoscopic fluorescence microscope

A1、A2 和 A3 分别为 05-036、夏芳和大造蚕卵产后 5 h 在正常光下的发光情况 Silkworm eggs of the variety 05-036 (A1), Xiafang (A2), and Dazao (A3) layed for 5 hours observed under normal light；B1、B2 和 B3 分别为 05-036、夏芳和大造蚕卵产后 5 h 在绿色荧光激发下的发光情况 Silkworm eggs of the variety 05-036 (B1), Xiafang (B2), and Dazao (B3) layed for 5 hours observed under stereoscopic fluorescence microscope；C1、C2 和 C3 分别为 05-036、夏芳和大造蚕卵产后 5 h 卵内容物在淡底光和绿色荧光激发下的发光情况 Yolk of silkworm eggs of the variety 05-036 (C1), Xiafang (C2), and Dazao (C3) layed for 5 hours observed under weak normal light and stereoscopic fluorescence microscope.

选的转基因阳性个体，也将大大提高最终的转基因成功率，缩短转基因周期。本文报道的外源 EGFP 基因快速表达体系，不但是成功进行家蚕转基因所必需的第一步，而且其自身也可以应用于基因的功能研究，例如将 A3 启动子替换为待研究的基因调控序列，即可非常方便地在时间和空间上定位该基因的表达，而用待研究的基因编码序列替换 EGFP 编码区或者插入到其上游或下游，又可研究该基因对胚胎发育进程的影响。

参 考 文 献（References）

Chalfie M，Tu Y，Euskirchen G，Ward WW，Prasher DC，1994. Green fluorescent protein as marker a for gene expression. *Science*，263（5 148）：802－805.

Grossman GL，Rafferty CS，Clayton JR，Stevens TK，Mukabayire O，Benedict MQ，2001. Germline transformation of the malaria vector *Anopheles gambiae*，with the piggyBac transposable element. *Insect Mol. Biol.*，10(6)：597－604.

Grossman GL，Rafferty CS，Fraser MJ，Benedict MQ，2000. The piggyBac element is capable of precise excision and transposition in cells and embryos of the mosquito，*Anopheles gambiae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，30(10)：909－914.

Guo XY，Dong L，Wang SP，Guo TQ，Wang JY，Chang DL，2004. Introduction of foreign genes into silkworm eggs by electroporation and its application in transgenic vector test. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*，36(5)：323－330.

Guo XY，Zhou ZY，Feng LC，Wang L，Lu C，Xiang ZH，2001. Sperm-mediated gene transformation of silkworm. *Prog. Biochem. Biophys.*，28(3)：423－425.［郭秀洋，周泽扬，冯丽春，汪琳，鲁成，向仲怀，2001. 利用精子介导法向蚕卵导入外源基因的研究. 生物化学与生物物理进展，28(3)：423－425］

Handler AM，Harrell RA，1999. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the piggyBac transposon vector. *Insect Mol. Biol.*，8(4)：449－457.

Horn C，Schmid BG，Pogoda FS，Wimmer EA，2002. Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，32(10)：1 221－1 235.

Tamura T，Thibert C，Royer C，Kanda T，Abraham E，Kamba M，Komoto N，Thomas JL，Mauchamp B，Chavancy G，Shirk P，Fraser M，Prudhomme JC，Couble P，2000. Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.*，18(1)：81－84.

Thomas JL，Da Rocha M，Besse A，Mauchamp B，Chavancy G，2002. 3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. *Insect Biochem. Mol. Biol.*，32(3)：247－253.

Tomita M，Munetsuna H，Sato T，Adachi T，Hino R，Hayashi M，Shimizu K，Nakamura N，Tamura T，Yoshizato K，2002. Transgenic silkworms produce recombinant human type Ⅲ procollagen in cocoons. *Nat. Biotechnol.*，21(1)：52－56.

Wu XF，Cao CP，2004. Targeting of human aFGF gene into silkworm *Bombyx mori* L. through homologous recombination. *J. Zhejiang Univ. SCI.*，5(6)：644－650.

Xia QY，Zhou ZY，Lu C *et al.*，2004. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm（*Bombyx mori*）. *Science*，306（5 703）：1 937－1 940.

（责任编辑：黄玲巧）